

# cDNA microarray解析を用いた、ヒト大腸癌細胞株 における5-FU感受性規定遺伝子の固定と、新規感受 性予測法

著者	村田 幸生
号	2359
発行年	2006
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22975">http://hdl.handle.net/10097/22975</a>

氏 名（本籍）	むら 村 た 田 ゆき 幸 お 生
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 3 5 9 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	Isolation of genes regulating 5-FU sensitivity in human colon cancer cell lines using cDNA microarray and a new sensitivity prediction method （cDNA microarray 解析を用いた、ヒト大腸癌 細胞株における5-FU 感受性規定遺伝子の固定と、 新規感受性予測法）
論文審査委員	（主 査） 教授 佐々木 巖 教授 八重樫 伸 生 教授 笠 井 憲 雪

## 論文内容要旨

汎用されている抗癌剤の中でも、フッ化ピリミジン系薬剤の中心である 5-Fluorouracil (5-FU) は、合理的使用を目的とした基礎・臨床研究が精力的に行われている。測定対象としてこれまで報告されている代表的な因子としては、thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) 等が挙げられるが、生体内に取り込まれた 5-FU は様々な修飾を受け代謝されるため、これら数種の発現解析だけでは 5-FU 系薬剤の感受性を予測するには充分とはいえないのが現状である。これを克服すべく、近年開発された DNA microarray 法による遺伝子の網羅的解析が、抗癌剤適正使用に応用されている。一方、治療開始前に癌細胞の薬剤感受性が予測できれば、治療の個別化が可能となり、更に、感受性を規定する因子が同定できれば、感受性の低い癌細胞も感受性を獲得させることができ、副作用で減量が必要な症例に低用量でも治療効果を上げることができると考える。

以上より、本研究の目的として、ヒト大腸癌細胞株を用いた cDNA array 解析を行い、5-FU の感受性を規定しているであろう遺伝子を抽出・同定し、更にはそれら抽出された遺伝子を用いて、5-FU の感受性を予測する新たな方法を開発することである。

用いたヒト大腸癌細胞株は COLO 205, COLO 320, LS 174 T, LS 180, MIP 101, Clone A, LoVo, HT 29, WiDr-TC, RKO, CX-1, HCT 8, HCT 15, HCT 116, T 84, SW 48, SW 480, SW 620, SW 948, SW 1116, DLD 1, KM 12 C の 22 種類である。まず、それぞれの IC<sub>50</sub> 値を MTT assay 法で求め、IC<sub>50</sub> の順に並べ替え、IC<sub>50</sub> が高値のもの、低値のもの、中間の値をとるものと各々グループ分けをした。元来、MTT assay 法自体、簡便であり、以前より施行されているが、精密度に欠けるところがある。それ故今回は、上位 4 個の細胞を High IC<sub>50</sub> 群、下位 4 個の細胞を Low IC<sub>50</sub> 群、それ以外を Middle IC<sub>50</sub> 群とした。次にそれぞれの細胞株につき cDNA microarray を施行した。再現性を確かめるべく培養から microarray までを 1 個の細胞につき独立して 2 回施行した。薬剤感受性候補遺伝子は、2 種類の統計学的手法により抽出した。1) two-sample t-test: High IC<sub>50</sub> 群と Low IC<sub>50</sub> 群とを比較する方法。2) Pearson 相関解析: IC<sub>50</sub> 値と正または負の相関を示す遺伝子を抽出する方法の 2 種類である。更に RT-PCR にて発現確認を行った。最後に、見つけてきた遺伝子を、新たに開発した予測プログラム two-margin SVM の入力データとして使い、IC<sub>50</sub> のそれぞれの群の予測実験を、leave-one-out 法で行った。

22 種の大腸癌細胞株は High IC<sub>50</sub> 群 (SW 620, HCT 8, SW 480, LS 174 T), Low IC<sub>50</sub> 群 (WiDr-TC, HCT 116, SW 48, RKO), Middle IC<sub>50</sub> 群 (残り 14 種の細胞株) に分けられた。

t-test において、High IC50 群で高発現した低感受性と関係のある遺伝子は6種、Pearson 相関解析で正の相関を示す低感受性と関係のある遺伝子は7種、反対に t-test において、Low IC50 群で高発現した高感受性と関係のある遺伝子は60種、Pearson 相関解析で負の相関を示す高感受性と関係のある遺伝子は69種であった。最終的に RT-PCR 法で発現確認した遺伝子群は、低感受性関連遺伝子が FKSG14, ABCB1, EPB41L4B, TBC1D7, BIN1, ZNF414, ZW10, LEAP-2, SMC2L1 であり、高感受性関連遺伝子が BAG4, BIT1, CREB1, MBNL1, PHLDA3, PXX, SLC13A4, PLAGL1, SMC1L1, PPP1R13B, ABCF3, ECGF1, PTK2B, ULBP1 であった。Microarray で抽出された遺伝子を新規感受性予測プログラム (TM-SVM) に入力し学習させ、leave-one-out 解析で IC50 のカテゴリーの識別率をみると、約 93% と高率であった。

以上の結果から、大腸癌細胞株を用い、cDNA microarray により抽出された遺伝子は感受性に関与する可能性が示唆された。アポトーシス、ABC トランスポーター、腫瘍免疫などに関係する遺伝子が抽出された。また、新規に開発した予測プログラムで高率の識別率が得られた。

本研究で用いた予測プログラムは感受性予測に応用でき、大腸癌細胞株で microarray により抽出された今回の感受性規定候補遺伝子と組み合わせることで、5-FU 感受性を高率で予測することが可能であり、将来的に臨床応用の可能性が考えられた。今後、臨床検体での検討及び抽出遺伝子の機能解析、他の薬剤での同様の解析、*in vivo* での解析が研究課題と考える。

## 審査結果の要旨

汎用されている抗癌剤の中でも、フッ化ピリミジン系薬剤の中心である 5-Fluorouracil (5-FU) は、大腸癌化学療法のキードラッグであり、合理的使用を目的とした臨床研究が精力的に行われている。これまで報告されている代表的な感受性規定因子として、thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidinephosphorylase (TP), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) 等が挙げられるが、生体内に取り込まれた 5-FU は様々な修飾を受け代謝されるため、これら数種の発現解析だけでは 5-FU 系薬剤の感受性予測するには充分とはいえないのが現状である。これを克服すべく、近年開発された DNA microarray 法による遺伝子の網羅的解析が、抗癌剤合理的使用に応用され、治療開始前の癌細胞の薬剤感受性を予測することで、治療の個別化が可能になると思われる。

以上より、本研究の目的として、ヒト大腸癌細胞株を用いた cDNA array 解析を行い、5-FU の感受性を規定しているであろう遺伝子を抽出・同定し、更にはそれら抽出された遺伝子を用いて、5-FU の感受性を予測する新たな方法を開発することである。

ヒト大腸癌細胞株 COLO 205, COLO 320, LS174T, LS180, MIP101, CloneA, LoVo, HT29, WiDr-TC, RKO, CX-1, HCT8, HCT15, HCT116, T84, SW48, SW480, SW620, SW948, SW1116, DLD1, KM12C の 22 種類を用い、先ず、それぞれの IC<sub>50</sub> 値を MTT assay 法で求め、IC<sub>50</sub> の順に並べ替え、IC<sub>50</sub> が高値のもの、低値のもの、中間の値をとるものと各々グループ分けをした。今回は、上位 4 個の細胞を High IC<sub>50</sub> 群、下位 4 個の細胞を Low IC<sub>50</sub> 群、それ以外を Middle IC<sub>50</sub> 群とした。次にそれぞれの細胞株につき cDNA microarray を施行した。再現性を確かめるべく培養から microarray までを 1 個の細胞につき独立して 2 回施行した。薬剤感受性関連候補遺伝子は、2 種類の統計学的手法により抽出した。1) two-sample t-test: High IC<sub>50</sub> 群と Low IC<sub>50</sub> 群とを比較する方法。2) Pearson 相関解析: IC<sub>50</sub> 値と正または負の相関を示す遺伝子を抽出する方法の 2 種類である。更に RT-PCR にて発現確認を行った。最後に、抽出された遺伝子を、新たに開発した予測プログラム two-margin SVM の入力データとして用い、IC<sub>50</sub> のそれぞれの群の予測実験を、leave-one-out 法で行った。

22 種の大腸癌細胞株は High IC<sub>50</sub> 群 (SW620, HCT8, SW480, LS174T), Low IC<sub>50</sub> 群 (WiDr-TC, HCT116, SW48, RKO), Middle IC<sub>50</sub> 群 (残り 14 種の細胞株) に分けられた。t-test において、High IC<sub>50</sub> 群で高発現した低感受性と関係のある遺伝子は 6 種、Pearson 相関解析で正の相関を示す低感受性と関係のある遺伝子は 7 種、反対に t-test において、Low IC<sub>50</sub> 群で高発現した高感受性と関係のある遺伝子は 60 種、Pearson 相関解析で負の相関を示す高感受性と関係のある遺伝子は 69 種であった。最終的に RT-PCR 法で発現確認した遺伝子群は、低感受性関連候補遺伝子が FKSG14, ABCB1, EPB41L4B, TBCID7, BIN1, ZNF414, ZW10, LEAP-2, SMC2L1 であり、高感受性関連候補遺伝子が BAG4, BIT1, CREB1, MBNL1, PHLDA3, PDK, SLC13A4, PLAGL1, SMC1L1, PP1R13B, ABCF3, ECGF1, PTK2B, ULBP1 であった。Microarray で抽出された遺伝子を新規感受性予測プログラム (TM-SVM) に入力し学習させ、leave-one-out 解析で IC<sub>50</sub> のカテゴリーの識別率をみると、約 93% と高率であった。

本研究で、大腸癌細胞株を用いた cDNA microarray により抽出された遺伝子は、感受性に関与する可能性が示唆され、今回開発した新規予測プログラムと、抽出された感受性関連候補遺伝子とを組み合わせることで、5-FU 感受性を高率で予測することが可能となり、将来的に臨床応用の可能性が考えられた。本研究は、抗癌剤感受性を予測する新たな方法を探索すると云う、大変貴重な研究であり、研究のプロットもしっかりしている。よって、審査の結果、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。